

Enzymatische Bildung von Östradiol-(17 β)-glucuroniden in der Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber

Von

Heinz Breuer und Dagmar Wessendorf

Aus der Chemischen Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Bonn

(Direktor: Prof. Dr. A. Gütemann)

(Der Schriftleitung zugegangen am 13. Dezember 1965)

Seit vielen Jahren ist bekannt, daß phenolische Steroide als Konjugate im Urin ausgeschieden werden. Bereits 1936 isolierten Cohen und Marrian¹ aus dem Schwangerenurin des Menschen eine wasserlösliche Steroidverbindung, die in weiteren Versuchen als ein Ring-D-Glucuronid von Östriol identifiziert werden konnte^{2,3}. Inzwischen ist es gelungen, Östriol-16 α -monoglucuronid^{4,5,6}, Östriol-17 β -monoglucuronid⁴, Östriol-3-monoglucuronid⁷, Östriol-3.16 α -diglucuronid⁸ sowie Östron-3-monoglucuronid⁹ mit Sicherheit im menschlichen Schwangerenurin nachzuweisen.

Die ausführlichen Untersuchungen von Dutton und Storey (vgl. l. c.¹⁰) haben gezeigt, daß die enzymatische Glucuronidierung zahlreicher Hydroxylverbindungen in der Leber stattfindet. Die Reaktion wird durch eine Glucuronyl-Transferase (EC 2.4.1.17) katalysiert, die Uridindiphosphat(UDP)-glucuronsäure als Cofaktor benötigt und in der Mikrosomen-Fraktion des Lebergewebes lokalisiert ist. Isselbacher¹¹ hat schon vor 10 Jahren die Bildung der neutralen Steroide in vitro untersucht und darauf hingewiesen, daß auch phenolische Steroide durch das mikrosomale Enzymsystem möglicherweise glucuronidiert werden könnten. Wie inzwischen gezeigt werden konnte, findet in der Tat eine Glucuronidierung von Östron durch die Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber statt, wobei Östron-3-monoglucuronid als Metabolit entsteht¹². In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob pheno-

¹ S. L. Cohen u. G. F. Marrian, *Biochem. J.* **30**, 57 [1936].

² S. L. Cohen, G. F. Marrian u. A. D. Odell, *Biochem. J.* **30**, 2250 [1936].

³ J. K. Grant u. G. F. Marrian, *Biochem. J.* **47**, 1 [1950].

⁴ J. G. D. Carpenter u. A. E. Kellie, *Biochem. J.* **78**, 1P [1961]; **84**, 303 [1962].

⁵ M. Neeman u. Y. Hashimoto, *Tetrahedron Letters* [London] **5**, 183 [1961]; *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 2972 [1962].

⁶ Y. Hashimoto u. M. Neeman, *J. biol. Chemistry* **238**, 1273 [1963].

⁷ C. G. Beling, *Acta endocrinol.* [Copenhagen], Suppl. **67**, 79 [1962].

⁸ C. B. Felger u. P. A. Katzman, *Federat. Proc.* **20** (1, part 1), 199 [1961].

⁹ E. R. Smith u. A. E. Kellie, *J. Endocrinology* **31**, XXIV [1965].

¹⁰ G. J. Dutton u. I. D. E. Storey, *Methods in Enzymol.* **5**, 195 [1962].

¹¹ K. J. Isselbacher, *Recent Progr. Hormone Res.* **12**, 134 [1956].

¹² E. R. Smith u. H. Breuer, *Biochem. J.* **88**, 168 [1963].

lische und alkoholische Hydroxylgruppen in phenolischen Steroiden [z. B. Östradiol-(17 β)] durch das mikrosomale Enzymsystem in unterschiedlichem Umfange glucuronidiert werden (vgl. l. c.¹²). Es erschien deshalb von Interesse, die Bildung von Östradiol-(17 β)-glucuroniden in der Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber näher zu untersuchen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, entstand unter den hier gewählten Versuchsbedingungen aus Östradiol-(17 β) etwa 20mal mehr Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid als Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid; daneben konnten geringe Mengen Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits früher¹² geäußerte Annahme, daß phenolische Hydroxylgruppen durch das mikrosomale Enzymsystem der Kaninchenleber besser glucuronidiert werden als alkoholische Hydroxylgruppen.

Methodik

Steroide: Östron, Östradiol-(17 β) und Östradiol-(17 β)-3-methyläther waren Handelspräparate. Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid wurde durch Reduktion von Östron-3-monoglucuronid mit NaBH₄ in Methanol dargestellt¹³. Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid und Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid wurden von Herrn Prof. H. H. Wotiz, Boston, zur Verfügung gestellt. Alle Steroide wurden papierchromatographisch und dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft.

Reagentien und Lösungsmittel: Alle verwendeten Reagentien waren von p. a.-Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt). Organische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Uridindiphosphat-glucuronsäure (Ammoniumsalz; Reinheitsgrad 95%) wurde von der Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA, *Helix-pomatia*-Extrakt von L'Industrie Biologique Francaise, Genevilliers (Seine), bezogen.

Tiere: Als Versuchstiere dienten Kaninchen beiderlei Geschlechts (Gewicht 2—3 kg), die durch Genickschlag getötet wurden. Nach dem Ausbluten der Tiere wurden die Lebern (70—140 g) entnommen und sofort aufgearbeitet.

Gewinnung der Mikrosomen-Fraktion: 40 g Lebergewebe wurde mit einer Schere in kleine Stücke zerschnitten und in 100 ml einer eiskalten 0,25M-Rohrzucker-Lösung portionsweise in einem Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Spinco-Zentrifuge L-50 für 45 Min. bei 20 000 $\times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 60 Min. bei 100 000 $\times g$ zentrifugiert. Die so gewonnene Mikrosomen-Fraktion wurde in 40 ml einer 0,154M KCl-Lösung aufgenommen, so daß 1 ml der Suspension die Mikrosomen-Fraktion aus 1 g Gewebe enthielt.

Inkubationen: Alle Versuche wurden im Schüttelthermostaten unter Luft durchgeführt; die Steroide wurden in Propylenglykol gelöst zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Aufarbeitung der Versuche: Die Inkubationslösungen wurden zur Entfernung der nicht-konjugierten Steroide dreimal mit je 8 ml Äther extrahiert und die Äther-Extrakte eingedampft (Freie Steroid-Fraktion). Anschließend wurde die wäßrige Lösung mit 12 ml 96proz. Äthanol versetzt und bei 4° über Nacht stehengelassen. Die Niederschläge wurden abzentrifugiert, mit 1 ml 96proz. Äthanol gewaschen und die vereinigten Überstände im Vak. bei 30—40° eingedampft. Der Rückstand wurde in 4,0 ml einer eiskalten 0,1N HCl aufgenommen und dreimal mit je 4 ml eiskaltem Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten Äthylacetat-

¹³ E. Diczfalusy, G. Franksson, B. P. Lisboa u. B. Martinsen, *Acta endocrinol.* [Copenhagen] **40**, 537 [1961].

Extrakte wurden mit 4 ml einer 0,1N HCl kurz gewaschen und im Vak. bei 30—40° eingedampft (Monoglucuronid-Fraktion). Die HCl-Phasen wurden vereinigt und unter Stickstoff und Eiskühlung mit 1N NaOH auf etwa pH 5 gebracht (Diglucuronid-Fraktion). Versuche mit authent. Östradiol-(17 β)-monoglucuronid und Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid zeigten, daß aus der 0,1N salzsäuren Lösung das Monoglucuronid zu 100% und das Diglucuronid zu etwa 15% mit Äthylacetat extrahiert wurden.

Zur enzymatischen Hydrolyse der Monoglucuronid-Fraktion wurde der Eindampfrückstand mit 10 ml eines 0,4M Acetat-Puffers (pH 5,2) und 1 ml eines Extraktes aus *Helix pomatia* (enthaltend 10000 Fishman-Einheiten β -Glucuronidase) versetzt und 16—18 Stdn. bei 37° hydrolysiert. Nach Beendigung der Hydrolyse wurde 3mal mit je 10 ml Äther extrahiert, wobei zur Beseitigung der starken Schaumbildung einige Tropfen einer 1proz. äthanol. Bradosol-Lösung zugesetzt wurden; die vereinigten Äther-Extrakte wurden eingedampft. Zur enzymatischen Hydrolyse der Diglucuronid-Fraktion wurde die auf pH 5 eingestellte wäBr. Lösung mit 5 ml eines 0,4M Acetat-Puffers (pH 5,2) und 1 ml eines Extraktes aus *Helix pomatia* versetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Quantitative Bestimmung: Die Eindampfrückstände der freien Steroid-Fraktion sowie der hydrolysierten Monoglucuronid- und Diglucuronid-Fraktionen wurden mit Dimethylsulfat methyliert und die 3-Methyläther an Al₂O₃ chromatographiert¹⁴. Die Kober-Reaktion der Östrogen-3-methyläther wurde unter optimalen Bedingungen nach Nocke¹⁵ durchgeführt.

In 4 Zusatzversuchen mit je 100 μ g Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid und Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid betrug die Gesamt-Wiederfindung (Aufarbeitung der Versuche und quantitative Bestimmung) für das Monoglucuronid 80% und für das Diglucuronid 70%. Für freies Östradiol-(17 β) betrug die Wiederfindung 80%.

Papierchromatographie: Die in Methanol aufgenommenen Trockenrückstände wurden auf formamidimprägniertem Papier mit Chloroform bei 20° chromatographiert. Die phenolischen Steroide wurden auf den Chromatogrammen mit Folin-Ciocalteu-Reagens¹⁶ sichtbar gemacht.

Dünnschichtchromatographie: In allen Versuchen diente Kieselgel G (E. Merck, Darmstadt) als Trägermaterial. Folgende Farbreaktionen wurden verwendet: Folin-Ciocalteu-Reaktion¹⁷ vor und nach Hydrolyse bei 120° in HCl-Atmosphäre, Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion¹⁸, Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reaktion¹⁹ und Naphthoresorcin-Reaktion²⁰ nach HCl-Hydrolyse (zur Darstellung der Glucuronsäure).

Ergebnisse

1. Identifizierung der Östrogenglucuronide

Nach Inkubation der Mikrosomen-Fraktion aus Kaninchenleber mit Östradiol-(17 β) in Gegenwart von Uridindiphosphat-glucuronsäure wurden die Versuchsansätze bis zur Monoglucuronid- und Diglucuronid-Fraktion aufgearbeitet (siehe Methodik).

¹⁴ J. B. Brown, *Biochem. J.* **60**, 185 [1955].

¹⁵ W. Nocke, *Biochem. J.* **78**, 593 [1961].

¹⁶ O. Folin u. V. Ciocalteu, *J. biol. Chemistry* **73**, 627 [1927].

¹⁷ B. P. Lisboa u. E. Diczfalusy, *Acta endocrinol.* [Copenhagen] **40**, 60 [1962].

¹⁸ J. S. Matthews, *Biochim. biophys. Acta* [Amsterdam] **69**, 163 [1963].

¹⁹ B. P. Lisboa u. E. Diczfalusy, *Acta endocrinol.* [Copenhagen] **43**, 545 [1963].

²⁰ B. C. Baldwin, D. Robinson u. R. T. Williams, *Biochem. J.* **71**, 639 [1959].

Östradiol-(17 β)-3- und Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid: Die Rückstände mehrerer Monoglucuronid-Fractionen (entsprechend 3—5 Inkubationsansätzen) wurden zur Abtrennung von weniger polaren Verunreinigungen der Dünnschichtchromatographie im System Methanol/Benzol 1:1 unterworfen (Laufzeit 1 Stde.). Die zwischen 0 und 3,5 cm (von der Startlinie aus gerechnet) befindliche Fläche wurde von der Platte abgeschabt und das Kieselgel dreimal mit 70proz. Äthanol eluiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die vereinigten äthanol. Lösungen eingedampft und dünnschichtchromatographisch im System Äthylacetat/Methanol/Essigsäure 7:4:1 untersucht. Dabei wurden 2 Substanzen nachgewiesen (G-1 und G-2), deren R_F -Werte mit denjenigen von authentischem Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid (0,42) und Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid (0,45) übereinstimmten. Da infolge Schwanzbildung eine vollständige Trennung der beiden Monoglucuronide nicht möglich war, wurden unter verschiedenen Bedingungen mehrere Farbreaktionen zur Identifizierung von G-1 und G-2 herangezogen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle zusammengefaßt. Daraus

Verhalten bei der Dünnschichtchromatographie (R_F -Werte und Farbreaktionen) der nach Inkubation von Östradiol-(17 β) mit der Mikrosomen-Fraktion aus Kaninchenleber nachgewiesenen Metaboliten G-1, G-2 und G-3 sowie von authent. Östradiol-(17 β)-glucuroniden. Einzelheiten über die Inkubation und die Farbreaktionen siehe Methodik.

Nachgewiesene Verbindung bzw. authent. Östradiol-(17 β)- glucuronid	R_F - Wert*	Farbe nach Behandlung mit				
		Folin- Ciocalteus- Reagens		Anis- aldehyd- H ₂ SO ₄	Vanillin- H ₂ SO ₄	Naphtho- resorcin
		vor	nach			
		Hydrolyse				
G-1						
3-Monoglucuronid	0,42	keine	blau	grün	violett	blau
		keine	blau	grün	violett	blau
G-2						
17 β -Monoglucuronid	0,45	blau	blau	grün	violett	blau
		blau	blau	grün	violett	blau
G-3						
3.17 β -Diglucuronid	0,1	keine	blau	grün	violett	blau
		keine	blau	grün	violett	blau

* System: Äthylacetat/Methanol/Essigsäure 7:4:1.

geht hervor, daß G-1 mit Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid und G-2 mit Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid identisch ist. Das 3-Monoglucuronid entstand in etwa 20fach höherer Ausbeute als das 17 β -Monoglucuronid.

Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid: Die salzsaure Lösung (aus 3—5 Inkubationsansätzen), welche die Diglucuronid-Fraktion enthielt, wurde unter Stickstoff und Eiskühlung neutralisiert und anschließend der Gelfiltration an einer Sephadex-Säule (G 25) unterworfen. Die diglucuronidhaltigen Eluate wurden eingedampft und die Rückstände dünnschichtchromatographisch im System Äthylacetat/Methanol/Essig-

säure 7:4:1 untersucht. Dabei wurde eine Substanz (G-3) aufgefunden, die durch ihren R_F -Wert und auf Grund ihres Verhaltens bei verschiedenen Farbreaktionen als Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid identifiziert werden konnte (Tabelle).

2. Kinetische Untersuchungen

In allen Versuchen wurden nicht nur die Östradiol-(17 β)-glucuronide, sondern auch das nicht-konjugierte, freie Östradiol-(17 β) quantitativ bestimmt. Dabei zeigte sich, daß innerhalb der Fehlergrenzen die Summe von konjugiertem und nicht-konjugiertem Östradiol-(17 β) konstant war. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, betrug bis zu einer Inkubations-

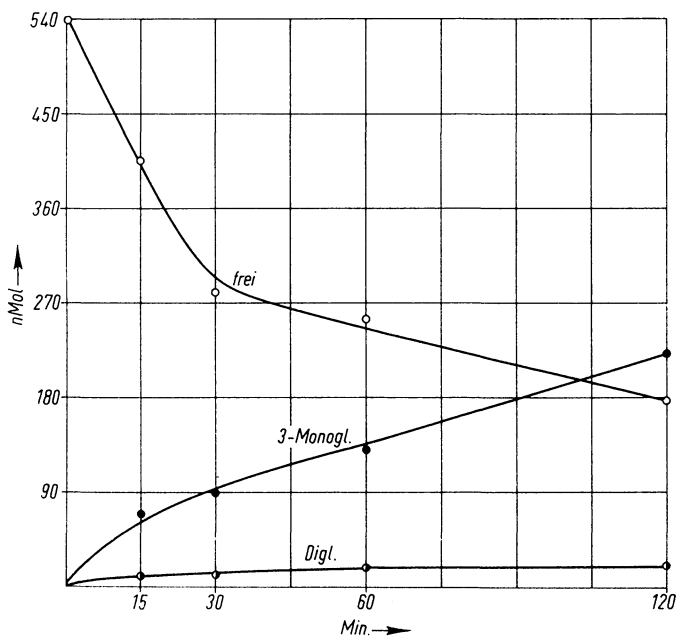


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von Östradiol-(17 β), der Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid sowie von Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid durch die Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber in Gegenwart von UDP-Glucuronsäure. Jeweils 2 ml Mikrosomen-Fraktion (entsprechend 2 g Kaninchenleber) wurden in 2 ml eines $1/15$ M Phosphat-Puffers (pH 8,2) mit 0,54 μ Mol Östradiol-(17 β) und 1,1 μ Mol UDP-Glucuronsäure bei 37° inkubiert. Jeder Punkt der Kurven ist ein Mittelwert aus 2 Einzelbestimmungen.

dauer von 120 Min. die Wiederfindung von konjugiertem und nicht-konjugiertem Östradiol-(17 β) zwischen 70 und 80% der eingesetzten Steroidmenge. Daraus ergibt sich die wichtige Feststellung, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Abbau von Östradiol-(17 β) zu hydroxylierten oder nicht-steroiden Reaktionsprodukten erfolgte.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, zeigt die Glucuronidierung von Östradiol-(17 β) zum 3-Monoglucuronid und zum 3.17 β -Diglucuronid ein Maximum zwischen pH 8,7 und 9,2; das pH-Optimum der Glucuronidbildung

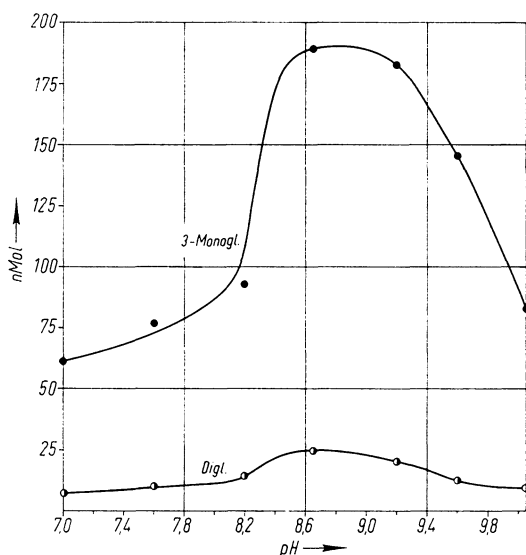


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Östradiol-(17 β)-3-mono-glucuronid und Östradiol-(17 β)-3.17 β -diglucuronid durch die mikrosomale Glucuronyl-Transferase der Kaninchenleber. Jeweils 2 ml Mikrosomen-Fraktion (entsprechend 2 g Kaninchenleber) wurden in 3 ml eines $1/15$ M Phosphat-Puffers (pH 7,0—8,2) bzw. 3 ml eines 0,1M Natriumborat-Puffers (pH 8,7—10,0) mit 0,54 μ Mol Östradiol-(17 β) und 1,1 μ Mol UDP-Glucuronsäure bei 37° für 30 Min. inkubiert. Zwischen pH 8,2 und 9,6 ist jeder Punkt der Kurve ein Mittelwert aus 4—6 Einzelbestimmungen, die übrigen Punkte sind Mittelwerte aus 2 Einzelbestimmungen.

ist nicht sehr scharf ausgeprägt. Die Abhängigkeit der Glucuronidierung von der Konzentration des Substrates [Östradiol-(17 β)] und des Cofaktors (UDP-Glucuronsäure) zeigen die Abb. 3 und 4 in Form der Lineweaver-Burk-Transformation. Bei einem pH-Wert von 8,7 beträgt K_m $2,8 \times 10^{-4}$ M für Östradiol-(17 β) [Konzentration von UDP-Glucuronsäure 4 μ Mol/5 ml] und für UDP-Glucuronsäure $2,9 \times 10^{-4}$ M [Konzentration von Östradiol-(17 β) 0,54 μ Mol/5 ml]. Die Temperaturabhängigkeit der Glucuronidierung im Bereich von 10—54° ist in Abb. 5 wiedergegeben. Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt bei 37°. Die Aktivierungsenergie der Glucuronyl-Transferase beträgt + 5,5 kcal/Mol, die Inaktivierungsenergie -8,5 kcal/Mol. Im Temperaturbereich von 10 bis 20° wurde ein Q_{10} -Wert von 1,4, im Temperaturbereich von 20—30° ein Q_{10} -Wert von 1,37 ermittelt.

Abb. 3. Enzymatische Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid durch die mikrosomale Glucuronyl-Transferase in Abhängigkeit von der Östradiol-(17 β)-Konzentration. Jeweils 2 ml Mikrosomen-Fraktion (entsprechend 2 g Kaninchenleber) wurden in 3 ml eines 0,1M Natriumborat-Puffers (pH 8,7) mit verschiedenen Mengen (0,1—1,0 μ Mol) Östradiol-(17 β) und 4 μ Mol UDP-Glucuronsäure bei 37° für 30 Min. inkubiert. Jeder Punkt der Kurve ist ein Mittelwert aus 2 Einzelbestimmungen.

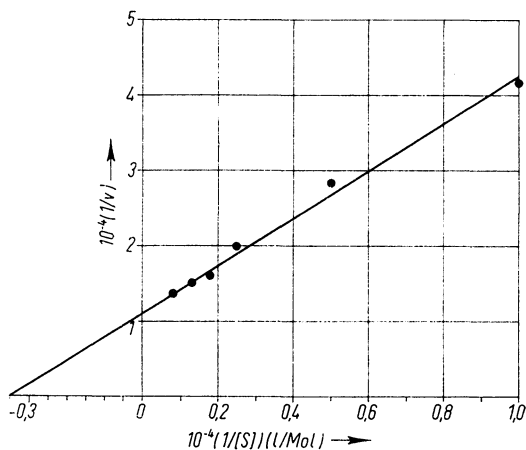
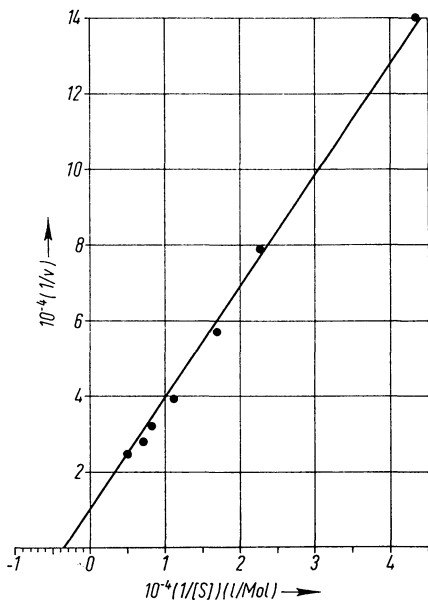


Abb. 4. Enzymatische Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid durch die mikrosomale Glucuronyl-Transferase in Abhängigkeit der UDP-Glucuronsäure-Konzentration. Jeweils 2 ml Mikrosomen-Fraktion (entsprechend 2 g Kaninchenleber) wurden in 3 ml eines 0,1M Natriumborat-Puffers (pH 8,7) mit verschiedenen Mengen (0,5—6,0 μ Mol) UDP-Glucuronsäure und 0,54 μ Mol Östradiol-(17 β) bei 37° für 30 Min. inkubiert. Jeder Punkt der Kurve ist ein Mittelwert aus 2 Einzelbestimmungen.

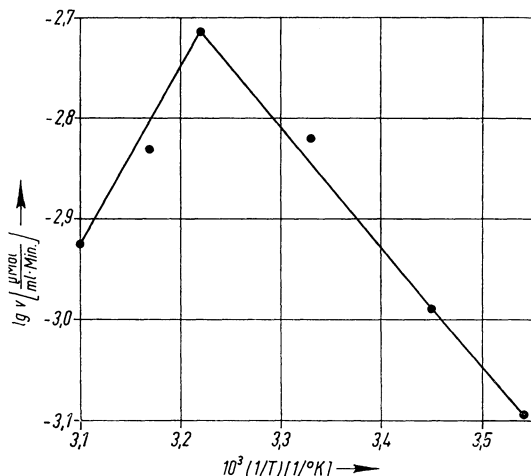


Abb. 5. Temperatur-Abhängigkeit der enzymatischen Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid durch die mikrosomale Glucuronyl-Transferase der Kaninchenleber. Jeweils 2 ml Mikrosomen-Fraktion (entsprechend 2 g Kaninchenleber) wurden in 3 ml eines 0,1M Natriumborat-Puffers (pH 8,7) mit 0,54 μMol Östradiol-(17 β) und 3,0 μMol UDP-Glucuronsäure bei verschiedenen Temperaturen für 30 Min. inkubiert. Jeder Punkt der Kurve ist ein Mittelwert aus 2 Einzelbestimmungen.

3. Versuche zur Inaktivierung

Die Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid wurde durch Zusatz von 10^{-3} bzw. 10^{-5}M (Endkonzentration) ZnCl_2 um 63 bzw. 37% gehemmt. 10^{-5}M *p*-Chlormercuri-benzoesäure hemmte die Glucuronidierung um 24%.

Diskussion

In Fortführung früherer Untersuchungen¹² konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber in Gegenwart von Uridindiphosphat-glucuronsäure in der Lage ist, Östradiol-(17 β) zu glucuronidieren. Unter den gewählten Versuchsbedingungen entstand als Hauptmetabolit Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid, während Östradiol-(17 β)-3,17 β -diglucuronid nur in geringer Menge gebildet wurde. Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid war kaum nachweisbar, so daß quantitative Bestimmungen dieses Glucuronids bei den kinetischen Untersuchungen nicht mit ausreichender Genauigkeit durchgeführt werden konnten. Die Beobachtung, daß die mikrosomale Glucuronyl-Transferase der Kaninchenleber bevorzugt die phenolische Hydroxylgruppe im Östradiol-(17 β)-Molekül angreift, bestätigt eine Annahme, die bereits früher auf Grund von Versuchen mit Östradiol-(17 β)-3-methyläther geäußert worden war¹²; dabei hatte sich gezeigt, daß Östradiol-(17 β)-3-methyläther in wesentlich geringerem Umfange glu-

curonidiert wurde als Östron, das nur eine phenolische Hydroxylgruppe besitzt.

Die Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid und auch von Östradiol-(17 β)-3,17 β -diglucuronid hatte ein Optimum bei einem pH-Wert von 8,7. Für die Bildung von Östron-3-monoglucuronid war dagegen in früheren Untersuchungen¹² ein pH-Optimum zwischen 8,0—8,2 festgestellt worden. Dieser erhebliche Unterschied legt die Vermutung nahe, daß in der Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber zwei verschiedene Glucuronyl-Transferasen enthalten sind, die beide phenolische Hydroxylgruppen glucuronidieren. Darüber hinaus ist offenbar die Affinität der mikrosomalen Glucuronyl-Transferase zu Östron größer als zu Östradiol-(17 β); so beträgt der K_m -Wert für Östron $9,7 \times 10^{-5} M^{12}$, während in der vorliegenden Arbeit für Östradiol-(17 β) ein K_m -Wert von $2,8 \times 10^{-4} M$ beobachtet wurde. Bei einem Vergleich der hier ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten für Östradiol-(17 β) und Uridindiphosphat-glucuronsäure läßt sich erkennen, daß das mikrosomale Enzym eine gleich große Affinität zum Substrat und Cofaktor hat. Durch eine Steigerung der Temperatur von 10 auf 20° nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Glucuronyl-Transferase um das 1,4fache, durch eine Steigerung von 20 auf 30° um das 1,37fache zu. Die relativ geringe Temperaturabhängigkeit im Bereich von 10—30° spricht für eine geringe Thermolabilität und damit für eine optimale Anpassung des Enzyms an das Substrat. Die Hemmung der Glucuronidierung von Östradiol-(17 β) durch *p*-Chlormercuri-benzoesäure deutet auf die Anwesenheit funktioneller SH-Gruppen hin; eine ähnliche Beobachtung wurde bereits früher von Isselbacher, Chrabas und Quinn²¹ für die solubilierte mikrosomale Glucuronyl-Transferase der Kaninchenleber sowie von Storey²² für Leberhomogenate der Maus gemacht. Aus diesen Befunden kann auf die Beteiligung eines Sulfhydryl-Protein-Komplexes an der Glucuronidierung von Östradiol-(17 β) geschlossen werden. Es sei vermerkt, daß die hier festgestellte Hemmung der Glucuronyl-Transferase auch von Isselbacher, Chrabas und Quinn²¹ für das gereinigte Enzym festgestellt wurde.

Bisher konnten Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid und Östradiol-(17 β)-3,17 β -diglucuronid im Urin des Menschen noch nicht nachgewiesen werden. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die Bildung beider Verbindungen vom enzymologischen Standpunkt aus durchaus möglich ist. Auf Grund dieser Befunde erscheint deshalb die weitere Suche nach Östradiol-(17 β)-glucuroniden beim Menschen gerechtfertigt.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung durchgeführt. Wir danken Herrn Dr. E. R. Smith, London, für wertvolle Hinweise und Fräulein Christa Schröder für ihre Mitarbeit.

²¹ K. J. Isselbacher, M. F. Chrabas u. R. C. Quinn, J. biol. Chemistry **237**, 3033 [1962].

²² I. D. E. Storey, Biochem. J. **90**, 15P [1964].

Zusammenfassung

Nach Inkubation von Östradiol-(17 β) mit der Mikrosomen-Fraktion der Kaninchenleber in Gegenwart von Uridindiphosphat-glucuronsäure wurde als Hauptmetabolit Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid identifiziert; daneben konnten geringe Mengen Östradiol-(17 β)-17 β -monoglucuronid und Östradiol-(17 β)-3,17 β -diglucuronid nachgewiesen werden.

Das pH-Optimum der Bildung von Östradiol-(17 β)-3-monoglucuronid durch die mikrosomale Glucuronyl-Transferase liegt bei 8,7. Die Michaelis-Menten-Konstanten betragen für Östradiol-(17 β) $2,8 \times 10^{-4}\text{M}$ und für Uridindiphosphat-glucuronsäure $2,9 \times 10^{-4}\text{M}$. Im Bereich von 10–30° wurden Q_{10} -Werte von 1,4 beobachtet. Die Aktivierungsenergie des Enzyms beträgt +5,5 kcal/Mol, die Inaktivierungsenergie –8,5 kcal/Mol. Durch Zusatz von *p*-Chlormercuri-benzoesäure (10^{-5}M) oder ZnCl_2 (10^{-3} und 10^{-5}M) wurde die Glucuronidierung von Östradiol-(17 β) gehemmt.

Die Versuche zeigen, daß die phenolische Hydroxylgruppe im Östradiol-(17 β)-Molekül durch die mikrosomale Glucuronyl-Transferase der Kaninchenleber in wesentlich größerem Umfange konjugiert wird als die alkoholische Hydroxylgruppe.

Summary

When oestradiol-17 β was incubated with the microsomal fraction of rabbit liver in the presence of uridine diphosphate glucuronic acid, oestradiol-17 β 3-monoglucuronide was identified as the main metabolite; in addition, small amounts of oestradiol-17 β 17 β -monoglucuronide and oestradiol-17 β 3,17 β -diglucuronide were detected.

The formation of oestradiol-17 β 3-monoglucuronide by the microsomal UDP glucuronyltransferase showed an optimum at 8.7. The Michaelis constants were $2.8 \times 10^{-4}\text{M}$ for oestradiol-17 β , and $2.9 \times 10^{-4}\text{M}$ for uridine diphosphate glucuronic acid. Within the range of 10–30°, the Q_{10} values were 1.4. The activation energy of the enzyme was found to be +5.5 kcal/Mol, the inactivation energy was –8.5 kcal/Mol. The glucuronidation of oestradiol-17 β was inhibited by *p*-chloromercuribenzoate (10^{-5}M) and zinc ions (10^{-5} – 10^{-3}M).

The results obtained demonstrate that, in rabbit liver microsomes, the rate of glucuronidation of oestradiol-17 β is significantly higher for the phenolic hydroxyl group than for the alcoholic hydroxyl group.

Prof. Dr. H. Breuer, Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik, Chemische Abteilung, 53 Bonn, Venusberg.